

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

PROJETO DE PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO: COMPOSTOS BIOATIVOS DA PRÓPOLIS NA MORFOFISIOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE

PROPONENTE: Dra. Cristiane Regina do Amaral Duarte

RESUMO:

A própolis é conhecida por suas propriedades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antifúngica, entre outras. Alguns estudos indicam que sua inclusão na alimentação animal pode promover melhora do desempenho produtivo e do status antioxidante dos animais, além de modular a morfofisiologia do trato gastrointestinal. No entanto, a própolis possui uma composição complexa, com mais de 300 compostos, que varia conforme a flora da região de coleta, época do ano e genética das abelhas. Assim, há uma grande dificuldade em estabelecer níveis adequados de própolis nas rações visto que ainda não está bem estabelecido quais desses compostos são responsáveis pelos seus efeitos na morfofisiologia do trato gastrointestinal e desempenho produtivo. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar a utilização de dois dos principais compostos bioativos da própolis (quercetina e ácido cafeico) na alimentação de frangos de corte. Para tanto, serão realizados quatro experimentos com a utilização de cinco níveis de cada um dos compostos: quercetina e ácido cafeico nas fases inicial (1 a 21 dias de idade) e crescimento (21 a 42 dias) para avaliação do desempenho, morfofisiologia do trato gastrointestinal (morfometria, expressão gênica de enzimas e transportadores intestinais de nutrientes, atividade de enzimas digestivas) e caracterização da microbiota intestinal. Com este estudo espera-se estabelecer dentre esses compostos qual é o principal responsável pelos efeitos da própolis na melhoria dos parâmetros produtivos e morfofisiologia do trato gastrointestinal e estabelecer o nível adequado de inclusão.

Palavras-chave: ácido cafeico, enzimas digestivas, quercetina, transportadores de nutrientes

I - IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA:

A produção brasileira de frangos de corte encontra-se em destaque no mercado nacional e internacional, com produção aproximada de 12,3 milhões de toneladas de carne e exportação de 31 % desse montante (AVISITE, 2014), consolidando-se como maior exportador mundial de carne de frango e com papel determinante no resultado das exportações do agronegócio brasileiro. Para que o crescimento da produção continue a ocorrer nos próximos anos, são necessários estudos que enfoquem os efeitos da nutrição na morfofisiologia do trato gastrointestinal, principalmente nos processos digestivos e absorptivos e modulação da microbiota intestinal, viabilizando, assim, a melhora dos índices produtivos.

A utilização de produtos naturais na alimentação de aves tem sido foco de pesquisas com o intuito de reduzir a utilização de antibióticos e promover melhorias na saúde intestinal dos animais. Neste sentido, a própolis, substância resinosa e balsâmica produzida pelas abelhas pela combinação de substratos retirados de exsudatos vegetais, cera, pólen e secreções salivares (Salatino *et al.*, 2005) tem se mostrado como uma alternativa devido às suas propriedades terapêuticas e biológicas que podem promover a saúde dos animais e manter o ambiente intestinal saudável. As suas principais atividades terapêuticas estão associadas às suas ações como antibacteriana, antioxidante (Cabral *et al.*, 2009), antiviral, antiinflamatória (Marcucci, 1996), antifúngica (Longhini *et al.*, 2007), imunoestimulante (Taheri *et al.*, 2005), entre outras.

Estas propriedades são atribuídas aos 300 compostos isolados, que incluem ácidos fenólicos, flavonóides, ésteres, aldeídos aromáticos, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas e minerais (Bankova *et al.*, 2000; Menezes, 2005; Lotfy, 2006). O grupo dos flavonoides tem sido o mais estudado como potente antioxidante, e também por interferir em diversos processos fisiológicos, como no metabolismo de carboidratos, com propriedade antihiperlipidêmica em ratos (Matsui *et al.* 2004).

A ação destes importantes compostos da própolis incluídos na ração de frangos de corte poderia aumentar a eficiência produtiva por melhorar a saúde intestinal. A saúde intestinal pode ser modulada pelo controle do crescimento de microorganismos patogênicos no trato gastrointestinal, o que beneficiaria as funções absorptivas e digestivas, com conseqüente aumento do desempenho.

Alguns autores relatam que a inclusão da própolis melhora o status imunitário de aves (Ziaran *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2011), o desempenho de poedeiras e frangos de corte (Shalmany & Shivazad, 2006; Tatli Seven *et al.*, 2008; Cetin *et al.*, 2010; Tekeli *et al.*, 2011), a atividade antioxidante de frangos expostos a estresse oxidativo (Tatli-Seven *et al.*, 2008;

Tatli-Seven *et al.*, 2009; Seven *et al.*, 2010) e atua na morfologia do fígado prevenindo lesões em decorrência de obesidade em frangos (Babinska *et al.*, 2013). Em contrapartida, outros estudos afirmam que a inclusão de própolis bruta e extrato etanólico da própolis não é recomendada para frangos de corte de 1 a 21 dias de idade (Duarte *et al.*, 2014; Eyng *et al.*, 2014). Apesar das observações relatadas por Eyng *et al.* (2014) não serem positivas quanto ao desempenho, o trabalho foi pioneiro ao correlacionar os efeitos da própolis sobre a morfofisiologia intestinal de frangos de corte com melhora na morfologia intestinal e na atividade de enzimas digestivas. Além disso, Eyng (2013) mostrou que a suplementação de extrato etanólico da própolis reduz a população de *Gammaproteobacteria*, potencialmente nocivas nos cecos de frangos de corte e que a suplementação de própolis bruta aumenta a população de bactérias estritamente benéficas e reduz as potencialmente nocivas. Embora os efeitos da própolis já tenham sido relatados por vários autores, alguns deles são contraditórios devido à grande variação na composição da própolis e nos níveis de inclusão estudados. Assim, estudos que avaliem os efeitos dos seus principais compostos bioativos isoladamente no desempenho são de grande interesse para se estabelecer os níveis ideais dos mesmos e, também, quais compostos são responsáveis pelos principais efeitos da própolis no trato gastrointestinal e, conseqüentemente, no desempenho produtivo.

II – QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA A SER ABORDADO:

Os antibióticos promotores de crescimento foram amplamente utilizados nas rações de aves nos últimos anos. Foi bem estabelecido que a sua utilização controla a colonização de microorganismos patogênicos no trato gastrointestinal, com conseqüente melhora do desempenho produtivo. No entanto, recentemente, houve uma grande preocupação com a possibilidade de que resíduos destes medicamentos permanecessem na carne e que pudessem ocasionar resistência cruzada em humanos. Assim, diversos países proibiram o uso dos antibióticos na criação de aves. Esta proibição fez com que houvesse grande interesse na comunidade científica em encontrar substitutos naturais, que não comprometessem a saúde humana e que melhorassem o desempenho dos animais assim como os antibióticos promotores de crescimento.

Dentre as alternativas naturais, a própolis, substância resinosa e balsâmica produzida pelas abelhas pela combinação de extratos extraídos de plantas, cera, pólen e secreções salivares, despertou grande interesse para ser utilizada nas rações devido aos seus compostos bioativos e à sua interferência em diversos processos fisiológicos.

A própolis bruta é composta basicamente por resinas e bálsamos, ceras, óleos essenciais e grãos de pólen (Funari & Ferro, 2006). Além destes compostos, elementos como minerais (Cu, Mn, Fe, Ca, Al, V, Si) e vitaminas do complexo B (B1, B2 e B6), C e E também podem ser encontrados (Menezes, 2005; Marcucci, 1996). No entanto, a composição da própolis varia muito de acordo com a flora local, características climáticas e geográficas e a genética das abelhas (Bankova, 2005; Sousa *et al.*, 2007).

A própolis é utilizada desde a Grécia Antiga como cicatrizante (Pereira *et al.*, 2002). Atualmente, sabe-se que a própolis atua nos organismos como potente antimicrobiano (Fernandes Júnior *et al.*, 2006), antioxidante (Cabral *et al.*, 2009), imunomodulador (Fischer *et al.*, 2008), anti-inflamatório (Almeida & Menezes, 2002) e antiviral (Marcucci, 1996). Estas propriedades biológicas são atribuídas à complexa composição química da própolis, que possui mais de 300 compostos isolados, entre eles, ácidos fenólicos, flavonóides, ésteres, aldeídos aromáticos, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas e minerais (Bankova *et al.*, 2000; Menezes, 2005; Lotfy, 2006). Dentre os flavonóides da própolis, são encontrados a quercetina, galangina, tectocrisina, pinocembrina, campferol. Os ácidos fenólicos geralmente encontrados na composição da própolis são o ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cinâmico e ácido cumárico.

A utilização da própolis nas rações de aves, principalmente em frangos de corte, já tem sido estudada, no entanto, os resultados ainda são controversos. Alguns resultados positivos da própolis na alimentação de frangos de corte foram publicados por Shalmany & Shivazad (2006), que mostraram que a utilização de extrato da própolis até o nível de 250 ppm melhora o desempenho de frangos de corte. Similarmente, foi mostrado que a ingestão de própolis melhora os índices produtivos de frangos de corte em condição de estresse calórico (Tatli Seven *et al.*, 2008). No entanto, outros autores mostraram que a utilização de própolis bruta e extrato da própolis não é recomendada para frangos de corte de 1 a 21 dias de idade (Duarte *et al.*, 2014; Eyng *et al.*, 2014). Eyng *et al.* (2014) também avaliaram a morfometria intestinal e a atividade de enzimas digestivas e mostraram que a utilização de extrato da própolis melhora os parâmetros de morfometria intestinal e modula a atividade das dissacaridases intestinais. De modo similar, a inclusão de própolis bruta nas dietas de frangos de corte de 1 a 21 dias alterou a morfofisiologia do trato gastrointestinal de frangos de corte (Duarte *et al.*, 2014).

O efeito da própolis e de seus compostos bioativos na morfofisiologia do trato gastrointestinal é esperado, visto que a própolis e alguns de seus compostos bioativos atuam como inibidores das α -glicosidades no intestino delgado promovendo diminuição na digestão

de carboidratos a monossacarídeos absorvíveis e, consequentemente decréscimo ou retardo na absorção destes (Matsui *et al.*, 2004). Estes autores sugerem ainda que a família de compostos do ácido cafeoilquínico pode ser a responsável por este efeito. Além disso, grande quantidade de compostos fenólicos presentes na própolis afetam o metabolismo da glicose, através da inibição da absorção no intestino, estimulação da secreção de insulina entre outros mecanismos (Hanhineva *et al.*, 2010).

Além disso, os efeitos benéficos da própolis na morfometria intestinal podem ser devido ao controle da proliferação de bactérias patogênicas no intestino, que podem causar danos à mucosa e reduzir as dimensões das vilosidades, evitando assim, que funções digestivas e absorptivas sejam prejudicadas (Sayrafi *et al.*, 2011). De fato, Eyng (2012) mostrou que a suplementação de extrato etanólico da própolis reduz a população de *Gammaproteobacteria*, potencialmente nocivas nos cecos de frangos de corte e que a suplementação de própolis bruta aumenta a população de bactérias estritamente benéficas e reduz as potencialmente nocivas.

Do mesmo modo, espera-se que a inclusão da própolis apresente efeito modulador de crescimento, devido à sua alta concentração de flavonoides, que possuem um grupamento hidroxil da aglicona posicionado similarmente aos estrógenos (Havsteen, 2002).

Embora os efeitos da própolis na alimentação de aves tenham sido amplamente estudados, são escassos os estudos que tenham indicado quais dos seus 300 compostos são os principais responsáveis por esses efeitos. Matsui *et al.* (2004) atribuíram os efeitos da própolis na atividade de dissacaridases intestinais à família de compostos do ácido cafeoilquínico.

Alguns compostos dessa família, como o ácido 5-cafeoilquínico, parecem não ser totalmente absorvidos no trato gastrointestinal, permanecendo intactos no intestino delgado, com uma parte hidrolisada pelas estearases da microflora do intestino grosso em ácido cafeico antes de ser absorvido (Azuma *et al.*, 2000). O ácido cafeico parece ser um importante modulador da atividade das dissacaridases no intestino, e aparentemente sem efeito sobre a amilase pancreática (Adisakwattana *et al.*, 2009). No entanto, os efeitos do ácido cafeico na atividade dessas enzimas são controversos (Matsui *et al.*, 2004). O ácido cafeico também é produto da metabolização do ester de fenetil do ácido cafeico (CAPE), um dos principais componentes da própolis que previne injúrias intestinais pela redução de processos inflamatórios, peroxidação lipídica e estresse oxidativo (Tayman *et al.*, 2011).

Devido à interação da microbiota com esses compostos, participando da hidrólise desses compostos, espera-se que a composição bacteriana do intestino seja modulada com a suplementação com o ácido cafeico, com possível melhora nos índices produtivos de frangos.

De fato, o ácido cafeico apresenta efeito inibitório no crescimento de bactérias patogênicas como *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* entre outras (Rodriguez-Vaquero *et al.*, 2007). Estes autores mostraram ainda que o ácido cafeico não inibe o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* provavelmente devido à sua capacidade de metabolizar ácidos fenólicos.

Outro composto presente na própolis com possíveis efeitos no desempenho e morfofisiologia do trato gastrointestinal é a quercetina. A quercetina é um flavonóide pertencente à classe dos flavonóis e é potencialmente benéfico à saúde humana devido às suas propriedades antioxidantes (Arts *et al.*, 2004) e antibacteriano (Waage & Hedin, 1985). Embora seja mostrado que os flavonóides são pouco absorvidos no trato gastrointestinal (Lorrain *et al.*, 2010), Kahle *et al.* (2011) mostraram que a quercetina foi recuperada no soro e urina de ratos. Em frangos, foi mostrado que a quercetina é metabolizada e absorvida, com detecção dos seus metabólitos no plasma, fígado, carne da coxa e sobrecoxa e duodeno (Rupasinghe *et al.* 2010). Liu *et al.* (2014) mostraram que a suplementação de quercetina na dieta de poedeiras melhora o desempenho produtivo pela modulação do ambiente intestinal. Segundo esses autores, os resultados indicam que a quercetina pode agir como um metabólico prebiótico e que aliado com suas propriedades antibacterianas pode afetar positivamente a microbiota intestinal do ceco. A suplementação de quercetina apropriada para poedeiras, segundo este estudo, é de 0,367 a 0,369 g/kg de ração.

Recentemente, Goliomytis *et al.* (2014) avaliaram o efeito da inclusão de 0,05 e 0,1% de quercetina no desempenho de frangos de corte, qualidade da carne e estabilidade oxidativa e mostraram que houve uma piora na conversão alimentar com o aumento dos níveis de inclusão, a qual os autores atribuem à metodologia empregada na confecção das rações, com diluição das dietas com quercetina. No entanto, houve redução na taxa de oxidação lipídica da carne, aumentando o tempo de prateleira.

Diante do exposto, observa-se que é de grande valia estudar os efeitos isolados dos compostos bioativos da própolis (quercetina e ácido cafeico) na alimentação de frangos de corte, e determinar qual possui maior eficácia sobre o desempenho produtivo e na morfofisiologia do trato gastrointestinal. Além disso, este estudo leva em consideração as diferenças na morfofisiologia do trato gastrointestinal e principalmente da microbiota intestinal durante o período de criação, por isso os compostos serão avaliados na fase inicial e de crescimento. Durante os primeiros 21 dias de idade, há um rápido desenvolvimento do trato gastrointestinal, que é de suma importância para o desenvolvimento do animal e desempenho. Após a eclosão, o trato gastrointestinal é rapidamente colonizado por

populações microbianas que podem ou não ser benéficas (Gong *et al.*, 2008), sendo que esta colonização é estável a partir dos 14 dias de idade no intestino delgado e entre 14 e 25 dias no ceco (Amit-Romach *et al.*, 2014).

III – OBJETIVOS E METAS A SEREM ALCANÇADOS:

Avaliar a utilização dos compostos bioativos da própolis (quercetina e ácido cafeico) na alimentação de frangos de corte nas fases inicial e crescimento e seus efeitos na morfofisiologia do trato gastrointestinal e microbiota intestinal.

Objetivos Específicos:

- Avaliar os efeitos dos compostos bioativos da própolis (quercetina e ácido cafeico) no desempenho produtivo de frangos de corte;
- Analisar os efeitos da suplementação de compostos bioativos da própolis na morfometria intestinal e na atividade das dissacaridases intestinais (sacarase e maltase) e das enzimas digestivas pancreáticas (lipase, amilase, tripsina e quimiotripsina) de frangos de corte;
- Avaliar os efeitos da suplementação de compostos bioativos da própolis na expressão gênica de enzimas digestivas e transportadores intestinais de nutrientes;
- Caracterizar a microbiota intestinal de frangos de corte de acordo com a suplementação dos compostos bioativos da própolis (quercetina e ácido cafeico);
- Estabelecer o melhor nível de suplementação para cada um dos compostos bioativos da própolis (quercetina e ácido cafeico) nas rações de frangos de corte;
- Estabelecer dentre os compostos bioativos da própolis que serão estudados (quercetina e ácido cafeico) quais são responsáveis pelos efeitos da própolis no desempenho, morfofisiologia do trato gastrointestinal e microbiota intestinal.

Metas:

Este projeto visa a compreensão dos efeitos da suplementação da ração de frangos de corte com compostos bioativos da própolis (quercetina e ácido cafeico) na morfofisiologia do trato gastrointestinal e microbiota intestinal de frangos de corte, a fim de promover a melhora do desempenho produtivo.

IV. METODOLOGIA A SER EMPREGADA

Serão realizados quatro experimentos no Setor de Avicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá.

Experimento I: Utilização da quercetina na alimentação de frangos de corte na fase inicial

Experimento II: Utilização do ácido cafeico na alimentação de frangos de corte na fase inicial

Experimento III: Utilização da quercetina na alimentação de frangos de corte na fase de crescimento

Experimento IV: Utilização do ácido cafeico na alimentação de frangos de corte na fase de crescimento

Para cada um dos experimentos serão utilizados 150 frangos de corte Cobb-Vantress provenientes de matrizes de 40 semanas, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos (controle + 4 níveis de suplementação), com 6 repetições e 5 aves por unidade experimental.

As aves serão alojadas em gaiolas de metabolismo posicionadas dentro de um galpão convencional, com cobertura de telha fibrocimento, piso de concreto e paredes laterais de alvenaria com 0,40 metros de altura. Para os experimentos na fase de crescimento, os animais serão alojados em galpão dividido em boxes até os 21 dias de idade e serão posteriormente transferidos para as gaiolas de metabolismo. Durante os primeiros cinco dias de vida, os pisos das gaiolas serão forrados com papel kraft trocados diariamente. As gaiolas serão equipadas com comedouros de cano de PVC e bebedouros tipo copo de pressão, os quais serão substituídos gradativamente por bebedouros automáticos tipo copo. Para o aquecimento inicial dos pintos serão utilizadas lâmpadas infravermelhas dispostas em um suporte de madeira posicionado na parte traseira das gaiolas.

As dietas experimentais serão formuladas a base de milho e farelo de soja de acordo com os valores de composição química dos alimentos e as recomendações nutricionais para frangos de corte machos de desempenho médio propostas por Rostagno *et al.* (2011) para as fases de 1 a 21 dias de idade e de 22 a 42 dias de idade.

Aos 21 dias de idade ou 42 dias de idade conforme o experimento, duas aves por gaiola serão selecionadas aleatoriamente representando cada tratamento, com peso

representativo (média \pm 5%), para avaliação da morfofisiologia intestinal e caracterização da microbiota intestinal.

VARIÁVEIS A SEREM AVALIADAS

1 - Desempenho

Serão avaliados ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar durante cada fase de criação. As pesagens das aves e das rações experimentais serão realizadas semanalmente para determinação do consumo de ração e conversão alimentar.

A mortalidade das aves será registrada diariamente, possibilitando a determinação da viabilidade do lote em função dos tratamentos estudados. As possíveis causas de mortalidade serão determinadas através de necropsia.

2 - Análise da morfofisiologia do trato gastrointestinal

Para a avaliação da morfofisiologia do trato gastrointestinal através das análises citadas abaixo, serão coletados fragmentos de mucosa do jejuno, o pâncreas e o ceco de duas aves por unidade experimental em cada idade avaliada.

2.1. Peso relativo dos órgãos do trato gastrointestinal

Os órgãos do trato gastrointestinal (proventrículo, moela, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas e fígado) de duas aves por gaiola (12 aves por tratamento) serão coletados para determinação do peso relativo (% do peso vivo) dos órgãos e comprimento do intestino delgado.

2.2. Análise morfométrica

Os fragmentos da região medial do jejuno serão coletados e lavados em solução salina, fixadas em formol 10%, e em seguida desidratadas em uma série de concentrações crescentes de alcoóis, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Serão feitos cortes histológicos transversais e semi-seriados, com cinco micrômetros de espessura que serão corados pelo método de Hematoxilina-Eosina. A captura de imagens para análise morfométrica será realizada através de câmera digital de alta resolução, acoplada à microscópio. Para a leitura das imagens será utilizado um analisador de imagem computadorizado.

Em um total de 60 lâminas por colheita (cinco tratamento x 12 aves), serão efetuadas 60 medidas (30 medidas para altura de vilo e 30 para profundidade de cripta). As alturas dos

vilos serão medidas a partir da região basal do vilo, coincidente com a porção superior das criptas, até seu ápice. As criptas serão medidas da sua base até a região de transição cripta:vilo.

2.3. Enzimas intestinais

Após o sacrifício, a porção medial do jejuno de duas aves por repetição (12 aves por tratamento), será coletada, lavada em solução fisiológica, acondicionada em frascos previamente identificados e estocadas em nitrogênio líquido. Serão analisadas a atividade da sacarase e maltase intestinais (Dahlquist, 1964). Para a determinação das enzimas intestinais, as amostras serão descongeladas e a mucosa será raspada e homogeneizada após a adição de quatro partes de água destilada. Alíquotas do homogeneizado serão incubadas com substratos apropriados (sacarose ou maltose). A glicose liberada durante a reação será determinada pelo método de glicose-oxidase¹. A atividade será expressa em gramas de mucosa ou miligrama de proteína medida pelo método de Bradford (1976).

2.4. Enzimas pancreáticas

O pâncreas de duas aves por repetição (12 aves de cada tratamento) será congelado em nitrogênio líquido para posterior análise de enzimas pancreáticas. No momento das análises, as amostras serão descongeladas e homogeneizadas para determinação das enzimas pancreáticas: lipase (EC 3.1.1.3), amilase (EC 3.2.1.1), quimiotripsina (EC 3.4.4.5) e tripsina (EC 3.4.4.4), expressas em relação à quantidade de proteína no tecido, conforme metodologia descrita por Bradford (1976).

A atividade das enzimas pancreáticas será determinada após o pâncreas ser homogeneizado em solução tampão 50 mM Tris-HCl em pH 8,0 na proporção de 1/20. Para a ativação do tripsinogênio será adicionada enteroquinase no homogeneizado.

A atividade da tripsina será medida pela hidrólise de p-nitroaniline benzoyl-DL-arginine-(BAPNA) em pH 8.2 (Kakade *et al.*, 1974). A atividade será expressa em nmol p-nitroaniline liberada por minuto. Método similar será utilizado para a determinação da quimiotripsina (Erlanger *et al.*, 1966), sendo o BAPNA substituído pelo N-glutaryl-L-phenylalanine-p-nitroanilide (GPNA). A reação será interrompida com solução de ácido acético 3%.

A amilase será determinada por método iodométrico. Uma unidade amilolítica será considerada como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolizar 10 mg de amido

em 30 minutos. A atividade da lipase será determinada por método colorimétrico. Neste método a lipase hidroliza o tioéster produzindo um tioálcool que reage com ácido nitrobenzóico liberando um ânion de cor amarela. A intensidade da coloração é proporcional à concentração de enzimas. A atividade da enzima será expressa em unidade internacional.

2.5-Expressão gênica de transportadores de nutrientes

Após o sacrifício, uma porção do jejuno, de 12 aves de cada tratamento, será coletada para análise da expressão gênica de enzimas (aminopeptidase, maltase e complexo sacarase-isomaltase) e transportadores intestinais (SGLT1, GLUT2, PEPT1). A mucosa será raspada e submetida ao protocolo Trizol (Invitrogen®) de extração de RNA total. A expressão gênica será investigada por RT-PCR em tempo real. Para tanto, será utilizado o Central de Biologia Molecular, Estrutural e Funcional (COMCAP), da Universidade Estadual de Maringá.

Extração de RNA (Protocolo Trizol – Invitrogen®) e reação de transcrição reversa (Protocolo Superscript III - Invitrogen®)

A extração de RNA será realizada segundo o protocolo Trizol Invitrogen®. Ao final da extração, as amostras de RNA total serão solubilizadas em 10 µl de água destilada e autoclavada. As concentrações das amostras de RNA total serão mensuradas por espectrofotometria (Biophotometer-Eppendorf®).

A fim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico interfira nos resultados, todas as amostras de RNA total serão tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR. Conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade (Invitrogen®), o volume da solução de RNA total a ser tratado com DNase será calculado a fim de conter 1µg de RNA total. A este volume, será adicionado 1µl de tampão DNase, 1µl de DNase I (1unidade/µl) e água “RNase free” suficiente para completar 10µl. Essa solução permanecerá à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, será acrescida de 1µl de EDTA (25mM) e incubada a 65°C por 10 minutos para inativação da enzima. Após esse procedimento, as amostras serão transferidas para o gelo e imediatamente submetidas à reação de transcrição reversa.

Para a reação de transcrição reversa (RT), será utilizado o “kit” SuperScript III (Invitrogen®), cujo protocolo inicia-se pela adição em tubo estéril de 8µl da solução de RNA total tratada com DNase, 1µl de oligonucleotídeo iniciador Oligo dt (500µg/ml), 1µl de dNTP Mix (10nM) e 3 µl de água estéril. Essa solução será incubada à 65° C por 5 minutos e, em seguida, sofrerá uma segunda incubação em gelo por 1,5 minuto. Após essas etapas, será

adicionado à solução 4µl de tampão “First Strand” 5X, 1µl de DTT (0,1M) e 1µl de “RNase OUT Inhibitor” (40unidades/µl). Na sequência, será acrescido 1µl (200 U) de SuperScript III (transcriptase reversa) e se iniciará a incubação, primeiramente a 50° C por 50 minutos, depois a 70° C por 15 minutos e, finalmente, em gelo por 2 minutos. As amostras serão mantidas em gelo para utilização imediata no PCR ou armazenadas (-20° C).

Investigação da expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão dos genes alvo será investigada por ensaio de PCR em tempo real a partir de RNAm proveniente do jejuno. Para a amplificação dos genes será utilizado o sistema Power Sybr®Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) no aparelho Rotor Gene Q-6000 (Qiagen – COMCAP, UEM), juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores correspondentes (Tabela 1).

Análise dos dados de PCR em tempo real

A análise dos dados será feita pela estimativa da eficiência de amplificação de cada amostra em questão utilizando o software “LinRegPCR” (RAMAKERS *et al.*, 2003) que considera a eficiência com base na curva de amplificação individual de cada tubo. No mínimo 4 pontos de cada curva de amplificação na fase exponencial serão delimitados e a média desses valores determinará o Threshold para cada gene. A eficiência de cada gene será calculada pela média das eficiências individuais de cada tubo. Diferenças na taxa de expressão dos genes serão normalizadas pela frequência de expressão β -actina. A expressão relativa dos genes analisados será determinada pelo método de Pfaffl.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (S: oligonucleotídeo iniciador “sense”
A: oligonucleotídeo iniciador “antisense”).

Gene	Sequência	Tamanho fragmento (pb)
β -actina*	S 5' CACAGATCATGTTTGAGACTT 3' A 5' CATCACAATACCAGTGGTACG 3'	101
Maltase**	S 5' TTGCCTCCCGGATACTCAGTGTTT 3' S 5' TTAGCAGCGCATCCAGGAAGTT 3'	113
Complexo sacarase- isomaltase **	S 5' ACAGCAAATCGCTTCCGGTT 3' A 5' AAAGCACTTTCCCGCTCACT 3'	175
Aminopeptidase *	S 5' AATACGCGCTCGAGAAAACC 3' A 5' AGCGGGTACGCCGTGTT 3'	70
SGLT1*	S 5' GCCGTGGCCAGGGCTTA 3' A 5' CAATAACCTGATCGTTGCACCAGTA 3'	66
GLUT2*	S 5' CACACTATGGGCGCATGCT 3' A 5' ATTGTCCCTGGAGGTGTTGGT 3'	68
PEPT1*	S 5' CCCCTGAGGAGGATCACTGTTGGCATGTT 3' A 5' CAAAAGAGCAGCAGCAACGA 3'	66

* Sequência de oligonucleotídeos publicadas por Gilbert *et al.*, 2007.

** Sequência de oligonucleotídeos publicadas por Duarte *et al.*, 2011.

2.6 – Caracterização da microbiota intestinal

Duas aves por repetição representando a média de peso do tratamento serão selecionadas aleatoriamente para caracterização da microbiota intestinal. O ceco será removido e estocado a -20°C até o processamento. O conteúdo cecal será coletado e diluído em solução estoque estéril (1% peptone, 15% glicerol em água) na proporção de 1:10, e estocado a -20°C. A fixação das células será realizada de acordo com metodologia proposta por Amann *et al.* (1990). A amostra será centrifugada por dois minutos a 12000 rpm, ressuspendida em 500 µl de PBS e novamente centrifugada. O pellet formado será ressuspendido em 500 µl de PBS e 500 µl de álcool absoluto.

O material será estocado a -20°C até o processo de hibridização ser realizado. A hibridização das células fixadas será realizada adaptando-se o protocolo previamente publicado por Zoetendal *et al.* (2002). Para cada hibridização 200 µl de suspensão de células

será centrifugada a 12000 rpm por três minutos e ressuspensa em 100 µl de solução de hibridização (0,9M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 8,0], 0,1% [peso/volume] SDS) e adicionado respectivamente sondas com fluorocromo Cy-5 (100 ng/µl) (Tabela 2).

As amostras serão incubadas por 16 horas a 50°C no escuro, em forno de hibridização. Após este período, 900 µl de solução tampão baixa concentração salina pré-aquecida (0,225 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 8,0], 10 mM EDTA) será adicionada às amostras e incubado a 50°C por cinco minutos e ressuspensa novamente na solução tampão baixa concentração salina pré-aquecida, sendo este procedimento realizado por duas vezes adicionais. Após este processamento, as células serão centrifugadas a 12000 rpm por cinco minutos e ressuspensas em um mL de solução PBS gelada (pH 8,4).

As amostras serão analisadas utilizando-se o aparelho citômetro de fluxo (FACScalibur; COMCAP - UEM) e as proporções de células hibridizadas com as sondas serão calculadas contra 10.000 eventos. Esta proporção será corrigida subtraindo-se a proporção encontrada em amostras hibridizadas sem sondas. A porcentagem de bactéria será calculada considerando a proporção encontrada com a sonda Eub338 como sendo o total de bactéria (100%).

Tabela 2 – Sondas utilizadas para processo de hibridização fluorescente *in situ*.

Sonda	Sequência (5' – 3')	Grupo alvo	Referência
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	Amann <i>et al.</i> (1990)
LGC354A	TGGAAGATTCCTACTGC	<i>Lactobacillus spp.</i>	Meier <i>et al.</i> (1999)
Chis150	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	<i>Clostridiaceae</i>	Franks <i>et al.</i> (1998)
Entbac	CATGAATCACAAAGTGGTAAG	<i>Enterobacteriaceae</i>	Mittelman <i>et al.</i> (1997)
Gam42a	GCCTTCCCACATCGTTT	<i>Gammaproteobacteria</i>	Manz <i>et al.</i> (1992)
Bac 303	CCAATGTGGGGGAC	<i>Bacteroidaceae</i>	Manz <i>et al.</i> (1996)

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Como procedimento estatístico, para os dados obtidos em cada parâmetro, que apresentarem distribuição normal, será aplicado o teste de Dunnett ao nível de 5% de significância para comparar os níveis de inclusão com o tratamento controle. Para avaliar o melhor nível de inclusão, os parâmetros avaliados serão desdobrados em polinômios ortogonais permitindo a análise de variância e regressão de acordo com suas distribuições, utilizando o programa estatístico SAEG®. Os dados serão analisados segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = b_0 + b_1A_i + b_2A_i + b_3A_i + e_{ij}$$

em que:

Y_{ij} : observação da variável dependente na unidade experimental j submetida ao nível i do composto, onde i = são níveis;

b_0 : constante;

b_1 , b_2 e b_3 : são, respectivamente, coeficientes linear, quadrático e cúbico de regressão da variável dependente em função dos níveis de inclusão do composto;

e_{ij} : erro aleatório associado a cada observação Y_{ij}

V. PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS OU TECNOLÓGICAS DA PROPOSTA:

A meta parcial deste projeto é a produção de conhecimento científico sobre os efeitos da suplementação das rações de frangos de corte com os principais compostos bioativos presentes na própolis (quercetina e ácido cafeico) na morfofisiologia do trato gastrointestinal e caracterização da microbiota intestinal. Espera-se a identificação do composto que promova melhores resultados na saúde intestinal e processos digestivos e absorptivos, além do nível adequado de inclusão e como consequência, a melhora dos índices produtivos de frangos de corte em diferentes idades. Assim, espera-se compreender melhor a interferência desses compostos nos processos fisiológicos que ocorrem no intestino para melhor aproveitamento dos nutrientes.

Além disso, este estudo promoverá a aplicação de técnicas inovadoras de biologia molecular para melhor compreensão dos efeitos dos compostos bioativos da própolis no aproveitamento de nutrientes no trato gastrointestinal. Este projeto também promoverá a formação e aperfeiçoamento de alunos de pós-doutorado, doutorado, mestrado, apoio técnico e de iniciação científica.

Considerando a inovação do projeto, a área de concentração em Avaliação de Alimentos para Aves e as linhas de pesquisa a ela associada, serão sem dúvida beneficiadas e fortalecidas. O impacto científico será a partir de divulgação dos resultados em periódicos de seletiva política editorial (qualis A1 e A2), permitindo a disseminação do conhecimento no meio científico. Além disso, os resultados serão divulgados em eventos nacionais e internacionais.

VI. ORÇAMENTO DETALHADO

Custeio

Justificativa	Descrição	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Aves experimentais	600 Pintos de 1 dia	1,00	600,00
Ingredientes para rações experimentais	Aminoácidos sintéticos, milho, farelo de soja, fosfato bicálcico, suplementos vitamínicos e minerais, calcários e outros.		1.200,00
Compostos da própolis	Quercetina e ácido cafeico		4.000,00
Expressão gênica de transportadores intestinais	Trizol, DNase I , RNase Out, Superscript III, Primers, Power SbyrGreen PCR Master Mix		10.300,00
Atividade de enzimas intestinais e pancreáticas	Sacarose, maltose, N-glutaryl-L-phenylalanine-p-nitroanilide, p-nitroaniline benzoyl-DL-arginine, trizma-base, Kit glicose enzimático		1500,00
Coleta de Material Biológico	Tubo de eppendorf grad. c/ tampa reta, cap. 1,5ml, Tubo Falcon Conico de 50 ml, graduado c/ tampa, Caixas de luvas de látex, Material cirúrgico (cabo de bisturi, lâmina de bisturi, pinça Adson, pinça anatômica, pinça dente de rato, tesoura cirúrgica), ponteiros para micropipetas		700,00
Determinação da microbiota intestinal	5 Sondas para hibridização	600,00	3.000,00
Determinação da microbiota intestinal	Tubos para análises, solução salina específica		2.000,00
Morfologia Intestinal	Reagentes para histologia (Xilol, Álcool Absoluto PA, Corantes, Parafina, Cera de abelha, Estearina Pura, Permout)		1.200,00
Material de expediente	Material de escritório (cartucho para impressora, lápis, etiquetas, cd-rom, pastas, folhas de sulfite, papel vegetal)		500,00
Diárias e passagens	Participação em congressos para divulgação dos resultados da pesquisa		2.000,00
Sub- Total -1			27.000,00

Equipamentos e Material Permanente

Justificativa	Descrição	Quant.	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Refrigerador 300 litros	Armazenamento de soluções e amostras	1	1.300,00	1.200,00
Freezer 200 litros	Armazenamento de amostras	1	1.700,00	1.700,00
Sub-Total-2				3.000,00

Justificativa do equipamento permanente: Estes equipamentos são imprescindível para o armazenamento adequado das soluções de trabalho e das amostras para manter a integridade celular e das bactérias intestinais.

➔ **Sub-total-1 + Sub-Total-2 = R\$ 30.000,00**

VII. CRONOGRAMA FÍSICO-FINANCEIRO

a. Cronograma financeiro: Os recursos serão utilizados da seguinte maneira: 40% no ano de 2015; 40% no ano de 2016 e 20% no ano de 2017

b. Cronograma físico:

	2014	2015												2016					
Atividades	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Aquisição dos ingredientes		x	x																
Experimento I																			
Condução do experimento I			x																
Análises laboratoriais				x	x	x	x	x	x										
Tabulação de dados e análises estatísticas			x	x	x	x	x	x	x	x									
Redação do relatório parcial e resumos p/ congresso e artigos científicos									x	x	x								
Experimento II																			
Condução do experimento II											x								
Análises laboratoriais												x	x	x	x	x	x		
Tabulação de dados e análises estatísticas											x	x	x	x	x	x	x	x	
Redação do relatório parcial e resumos p/ congresso e artigos científicos																	x	x	x

	2016						2017											
Atividades	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	
	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Experimento III																		
Condução dos experimentos III	x	x																
Análises laboratoriais		x	x	x	x	x	x											
Tabulação de dados e análises estatísticas	x	x	x	x	x	x	x	x										
Redação do relatório parcial e resumos p/ congresso e artigos científicos							x	x	x									
Experimento IV																		
Condução do experimento IV							x	x										
Análises laboratoriais								x	x	x	x	x						
Tabulação de dados e análises estatísticas							x	x	x	x	x	x	x					
Redação do relatório final e resumos p/ congresso e artigos científicos													x	x	x	x	x	

VIII. IDENTIFICAÇÃO DOS DEMAIS PARTICIPANTES DO PROJETO

Coordenadora

Dra Cristiane Regina do Amaral Duarte

Pesquisadores

Profa Dra. Alice Eiko Murakami

Profa. Dra. Cinthia Eyng

Profa. Dra. Karla Paola Picoli

Profa. Dra. Elis Regina de Moraes Garcia

Alunos do Programa de Pós-Graduação

Mestrado

Leonardo Henrique Zanetti

Doutorado

Ana Flávia Quiles Garcia

Iván Camilo Ospina-Rojas

Mayra Diaz Vargas

Alunos de Iniciação Científica

Camila Alves Blasques Dias

Humberto Marques Lipori

Bianca Simoes Mascarin

X. INDICAÇÃO DE COLABORAÇÕES OU PARCERIAS JÁ ESTABELECIDAS COM OUTROS CENTROS DE PESQUISA NA ÁREA

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus de Marechal Cândido Rondon

Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes

Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados

Profa. Dra. Cinthia Eyng

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – Câmpus Aquidauana

Profa. Dra. Elis Regina de Moraes Garcia

IX. DISPONIBILIDADE EFETIVA DE INFRA-ESTRUTURA E DE APOIO TÉCNICO PARA O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO

A Universidade Estadual de Maringá possui a infraestrutura necessária para execução deste projeto. A Instituição conta com apoio técnico dos funcionários dos setores e laboratórios disponíveis.

Os experimentos, bem como a produção de rações, serão conduzidos na Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencente à UEM (aviários e fábrica de ração). As análises laboratoriais serão realizadas no Laboratório de Nutrição e Alimentação Animal (LANA) de departamento de Zootecnia, Laboratório de tecnologia de transformação e conservação de produtos agropécuarios, e no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP). Este complexo possui centrais de Análises Avançada de Materiais; de Agropecuária e Agronegócio; de Produtos Naturais; Microscopia e de Biologia Molecular, Estrutural e Funcional.

Detalhamento dos equipamentos oferecidos:

Laboratório de Nutrição e Alimentação Animal e demais laboratórios do Departamento de Zootecnia:

- Balanças de precisão;
- Micropipetadores automáticos;
- Espectrofotômetro;
- Freezer 80°C;
- Homogeneizador de tecidos.

Central de Biologia Molecular, Estrutural e Funcional

- Máquina de gelo;
- Freezer -80°C;
- Espectrofluorômetro (Flex Station III);
- Termocicladores;
- Termociclador de PCR em Tempo Real;
- Centrifuga refrigerada;
- Citômetro de fluxo

Central de Microscopia

- Ultramicrotomo;
- Microcópios ópticos;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADISAKWATTANA, S; CHANTARASINLAPIN, P; THAMMARAT H et al. A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal alpha-glucosidase. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 1194-1200, 2009
- ALMEIDA, EC; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.8, n.2, p.191-212, 2002.
- AMANN, RI; BINDER, BJ; OLSON, RJ et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.6, p. 1919-1925, 1990.
- AMIT-ROMACH, E, SKLAN, D; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poultry Science**, v. 83, p. 1093-1098, 2004.
- ARTS, M JTJ; DALLINGA, SJ; VOSS, HP et al. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. **Food Chemistry**, v. 88, p. 567–570, 2004.
- AVISITE – Estatísticas e Preços. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/economia/index.php?acao=carnefrango>. Acesso em: 14/jun/2014.
- AZUMA, K; IPPOUSHI, K; NAKAYAMA, M et al. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5496-5500, 2000. 39-46, 2010.
- BABIŃSKA, I; KLECZEK, K; MAKOWSKI, W et al. Effect of Feed Supplementation with Propolis on Liver and Kidney Morphology in Broiler Chickens. **Pakistan Veterinary Science**, v. 33, n.1, p.1-4, 2013.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p. 29-32, 2005.
- BANKOVA, V; CASTRO, SL; MARCUCCI, MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.
- BRADFORD, MM. A rapid and sensitive for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CABRAL, ISR; OLDONI, TLC; PRADO, A et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1523-1527, 2009.
- ÇETIN, E; SILICI, S; ÇETIN, N et al. Effects of diets containing different concentrations of propolis on hematological and immunological variables in laying hens. **Poultry Science**, v.89, p.1703-1708, 2010.

- DAHLQUIST, A. Method for assay of intestinal disaccharidases. **Analytical Biochemistry**, v.7, p. 447-454, 1964.
- DUARTE, CRA; VICENTINI-PAULINO, MLM; BURATINI, J JR et al. Messenger ribonucleic acid abundance of intestinal enzymes and transporters in feed-restricted and refed chickens at different ages. **Poultry Science**, v. 90, p. 863-868, 2011.
- DUARTE, CRA; EYNG, C; MURAKAMI, AE, SANTOS, TC. Intestinal morphology and activity of digestive enzymes in broilers fed crude propolis. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 94, p. 1-9, 2014
- ERLANGER, BF; EDEL, F; COOPER, AG. The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v.115, p.206-210, 1966.
- EYNG, C. Própolis bruta e extrato etanólico de própolis na alimentação de frangos de corte. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, UEM, 2012.
- EYNG, C; MURAKAMI, AE; DUARTE, CRA et al. Effect of dietary supplementation with an ethanolic extract of propolis on broiler intestinal morphology and digestive enzyme activity. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.98, p.393-401, 2014.
- FERNANDES JÚNIOR, A; LOPES, MMR; COLOMBARI, V et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.294-297, 2006.
- FISCHER, G; HÜBNER, SO; VARGAS, GD et al. Imunomodulação pela própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.2, p.247-253, 2008.
- FRANKS, AH; HARMSSEN, HJM; RAANGS, GC et al. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.9, p. 3336-3345, 1998.
- FREITAS, JA; VANAT, N; PINHEIRO, JW et al. The effects of propolis on antibody production by laying hens. **Poultry Science**, v.90, p.1227-1233, 2011.
- FUNARI, CS; FERRO, VO. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.171-178, 2006.
- GILBERT ER; LI H; EMMERSON DA et al. Developmental regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA abundance in the small intestine of broilers. **Poultry Science**, v. 86, p. 1739-1753, 2007.
- GOLIOMYTIS, M; TSOUREKI, D; SIMITZIS, PE et al. The effects of quercetina dietary supplementarion on broiler growth performance, meat quality, and oxidative stability. **Poultry**

GONG, J; YU, H; LIU, T et al. Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p. 1372-1382, 2008.

HANHINEVA, K; TÖRRÖNEN, R; BONDIA-PONS, I et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, p.1365-1402, 2010.

HAVSTEEN, B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v.96, p.67-202, 2002.

KAHLE, K; KEMPF, M; SCHREIER, P et al. Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. **European Journal of Nutrition**, v. 50, p. 507-522, 2011.

KAKADE, ML; RACKIS, JJ; MCGHEE, JG. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v.51, p.376-382, 1974.

LIU, Y; LI, Y; LIU, HN et al. Effect of quercetin on performance and egg quality during the late laying period of hens. **British Poultry Science**, v. 54, p. 510-514, 2013.

LOFTY, M. Biological activity of bee propolis in health and disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.7, p.22-31, 2006.

LONGHINI, R; RAKSA, SM; OLIVEIRA, ACP et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade fúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p. 388-395, 2007.

LORRAIN, B; DANGLES, O; GENOT, C. Chemical modeling of heme-induced lipid oxidation in gastric conditions and inhibition by dietary polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 676–683, 2010.

MANZ, W; AMANN, R; LUDWING, W et al. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. **Systematic and Applied Microbiology**, v.15, p. 593-600, 1992.

MANZ, W; AMMAN, R; LUDWING, W et al. Application of a suite of 16S rRNA specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. **Microbiology**, v.142, p. 1097-1106, 1996.

MARCUCCI, MC. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v.19, n.5, p.529-536, 1996.

- MATSUI, T; EBUCHI, S; FUJISE, T et al. Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.27, p.1797-1803, 2004.
- MEIER, H; AMANN, R; LUDWIG, W et al. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G + C content. **Systematic and Applied Microbiology**, v.22, p. 186-196, 1999.
- MITTELMAN, MW; HABASH, M; LACROIX, JM et al. Rapid detection of Enterobacteriaceae in urine by fluorescent 16S rRNA in situ hybridization on membrane filters. **Journal of Microbiological Methods**, v.30, p. 153-160, 1997.
- MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.405-411, 2005.
- PEREIRA, AS; SEIXAS, FRMS; AQUINO NETO, FR. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n.2, p. 321-326, 2002.
- RAMAKERS, C; RUIJTER, JM; DEPREZ, RH et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, v. 339, p. 62–66, 2003.
- Rodríguez-Vaquero, MJ; Alberto, MR; Manca de Nadra, MC et al. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, v. 18, p. 93–101, 2007.
- ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. L.; DONZELE, J. L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa:UFV, 2011. 252p.
- RUPASINGHE, HP; RONALDS, CM; RATHGEBER B et al. Absorption and tissue distribution of dietary quercetin and quercetin glycosides of apple skin in broiler chickens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1172-1178, 2010.
- SALATINO, A; TEIXEIRA, EW; NEGRI, G et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.33-38, 2005.
- SAYRAFI, R; SHAHROOZ, R; SOLTANALINEJAD, F et al. Histomorphometrical study of the prebiotic effects on intestine morphology and growth performance of broiler chickens. **Veterinary Research Forum**, v.2, n.1, p.45-51, 2011.
- SEVEN, I, AKSU, T, TATLI SEVEN, P. The effects of propolis on biochemical parameters and activity of antioxidant enzymes in broilers exposed to lead-induced oxidative stress. **Asian-Australasian. Journal of Animal Sciences**. v.23, p. 1482-1489, 2010.

- SHALMANY, SK; SHIVAZAD, M. The effect of diet propolis supplementation on Ross broiler chicks performance. **International Journal of Poultry Science**, v.5, n.1, p.84-88, 2006.
- SOUSA, JPB; FURTADO, NAJC; JORGE, R et al. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.85-93, 2007.
- TAHERI, HR; RAHMANI, HR; POURREZA, J. Humoral immunity of broilers is affected by oil extracted propolis (OEP) in the diet. **International Journal of Poultry Science**, v.4, n.6, p.414-417, 2005.
- TATLI SEVEN, PT; SEVEN, I; YILMAZ, M et al. The effects of Turkish propolis on growth and carcass characteristics in broilers under heat stress. **Animal Feed Science and Technology**, v.146, p.137-148, 2008.
- TATLI SEVEN, PT; YILMAZ, S; SEVEN, I et al. Effects of propolis on selected blood indicators and antioxidant enzyme activities in broilers under heat stress. **Acta Veterinary BRNO**, v.78, p.75-83, 2009.
- TAYMAN, C; TONBUL, A; KOSUS, A et al. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on intestinal damage in necrotizing enterocolitis. **Pediatric Surgery International**, v. 27, p. 1179-1180, 2011.
- TEKELI, A; KUTLU, HR; CELIK, L et al. Determination of the effects of *Z. officinale* and propolis extracts on intestinal microbiology and histological characteristics in broilers. **International Journal of Poultry Science**, v.9, n.9, p.898-906, 2010.
- WAAGE, KS; HEDIN, AP. Quercetin 3-O-galactosyl-(1 →6)-glucoside, a compound from narrowleaf vetch with antibacterial activity. **Phytochemistry**, v. 24, p. 243–245, 1985.
- ZIARAN, HR; RAHMANI, HR; POURREZA, J. Effect of dietary oil extract of propolis on immune response and broiler performance. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.8, n.10, p.1485-1490, 2005.
- ZOETENDAL, EG; BEN-AMOR, K; HARMSSEN, HJM et al. Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.9, p. 4225-4232, 2002.